

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-97789

(43) 公開日 平成5年(1993)4月20日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 237/06		7106-4H		
231/02				
237/22		7106-4H		
C 0 7 K 1/02		8318-4H		
// C 0 7 K 5/08		8318-4H		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-256536

(22) 出願日 平成3年(1991)10月3日

(71) 出願人 000229209

日本チバガイギー株式会社
兵庫県宝塚市美幸町10番66号

(72) 発明者 早川 謙二

兵庫県宝塚市逆瀬台1-11-4-1213

(72) 発明者 岩崎 源司

兵庫県宝塚市武庫山1-6-25-103

(72) 発明者 松永 伸一郎

兵庫県尼崎市東難波町1-1-4-104

(72) 発明者 小久保 利雄

兵庫県宝塚市伊子志4-2-60-126

(74) 代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

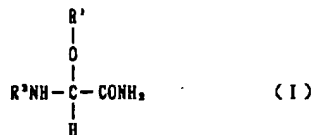
(54) 【発明の名称】 α -ヒドロキシグリシンアミド誘導体及びその製造方法

(57) 【要約】

【目的】 ラセミ化を伴わないでアミノ酸又はペプチドのC-末端カルボキシル基をアミド化することができるアミド化剤を得る。

【構成】 次の式 (I) :

【化1】



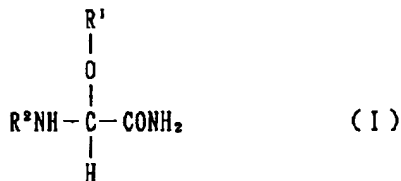
(式中、R¹ は水素原子、低級アルキル基、低級アルケニル基、低級アルキニル基、又はアルキル基によりもしくはアルキル基と芳香族基とにより置換されたシリル基を表わし；R² は水素原子又はアミノ保護基を表わす) により表わされる α -ヒドロキシグリシンアミド誘導体、及びその塩、その製造方法、並びにこの化合物を用いてアミノ酸もしくはペプチド又はこれらの誘導体のC-末端カルボキシル基をアミド化する方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の式 (I) :

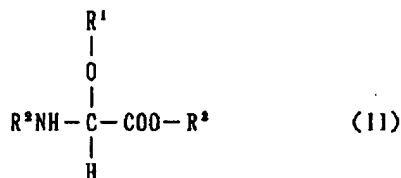
【化1】



(式中、 R^1 は水素原子、低級アルキル基、低級アルケニル基、低級アルキニル基、ベンジル基、又はアルキル基によりもしくはアルキル基と芳香族基とにより置換されたシリル基を表わし； R^2 は水素原子又はアミノ保護基を表わす) により表わされる α -ヒドロキシグリシンアミド誘導体、及びその塩。

【請求項2】 請求項1に記載の α -ヒドロキシグリシンアミド誘導体又はその塩の製造方法であって、次の式 (II) :

【化2】



(式中、 R^1 及び R^3 は式 (I) において定義したのと同じ意味を有し、そして R^3 は水素原子又はカルボキシル保護基である) で表わされる α -ヒドロキシグリシン誘導体を溶媒中アンモニアで処理し、所望によりアミノ保護基を除去し、そして所望により得られた化合物をその塩に転換することを特徴とする方法。

【請求項3】 アミノ酸もしくはペプチド又はこれらの誘導体を請求項1に記載の α -ヒドロキシグリシン誘導体と反応せしめることを特徴とするC-末端アミド化ペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は α -ヒドロキシグリシン誘導体及びその塩に関し、この化合物はC-末端アミド化ペプチドの製造のために有用である。

【0002】

【従来の技術】 生理活性のためにC-末端がアミド化されていることを必須とする種々のペプチド性生理活性物質が知られている。これらの生理活性ペプチドの例としてメラニン細胞刺激ホルモン放出抑制ホルモン (Pro-Leu-Gly-NH₂) (R. M. G. Nairら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1376(1971) ; M. E. Celisら、Pro. Nat. Acad. Sci., USA, 68, 1428(1971)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (Pyro-Glu-His-Pro-NH₂) (K. Folkersら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 123, 705(1969) ; Endo

2

crinol., 86, 1143(1970) ; R. Burgusら、Compt. Rend. Acad. Sci., 269, 1870(1969) ; Nature, 226, 321(1970)、等が挙げられる。

【0003】 これらの生理活性C-末端アミド化ペプチドの製造方法としては、ペプチドのC-末端のカルボキシル基をアンモニアによりアミド化する方法 (Zhang Hongliangら、Yiyao Gongye, 3, 3(1983) ; Chem. Abst. 9, 639(1983) ; Vlassa M., Rev. Roum. Chim., 21, 455(1976) ; Rivaille Pierreら、Helv. Chim. Acta 54, 355(1971) ; Folkers Karlら、J. Med. Chem. 14, 475-6(1971) ; Beyerman, H. Cら、Rect. Trav. Chim. Pays-Bas, 90, 791(1971) ; Folkers Karlら、Chem. Abst., 79, 459(1973))、グリシンアミド又はプロリンアミドとの化学的又は酵素的縮合反応による方法 (Muro Tetsuoら、Agric. Biol. Chem., 51, 1207(1987) ; Flouret George, J. Med. Chem., 13, 843(1970) ; Flouret George, Chem. Abst., 75, 246(1971) ; Wissmann Hansら、Chem. Abst., 76, 449(1972) ; H. Chitoshiら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 1345(1974) ; Kurath P. ら、Helv. Chim. Acta., 56, 1656(1973) ; Bienert Michaelら、Chem. Abst. 86, 455(1976) ; Bienert M., Pharmazie 32, 397(1977)) が知られている。

【0004】 しかしながら、前記の化学的方法においては、保護されたC-末端カルボキシル基とアンモニアガスとを反応せしめる方法であり、この場合光学活性ペプチドのラセミ化を促進するため、ラセミ化を伴わずにC-末端をアミド化することはできない。

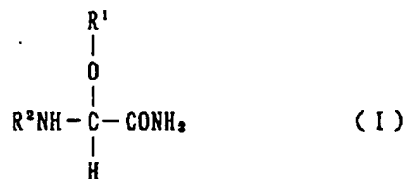
【0005】

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明はラセミ化を伴わないでペプチドのC-末端アミド化を行うための新規な手段を提供しようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、次の式 (I) :

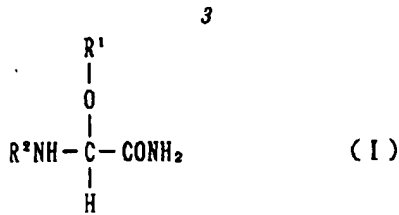
【化3】



で示される化合物をアミノ基供与体として使用することにより、C-末端カルボキシル基が保護されていないペプチドの該カルボキシル基を、ラセミ化を伴わないでアミド化できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】 従って本発明は、次の式 (I) :

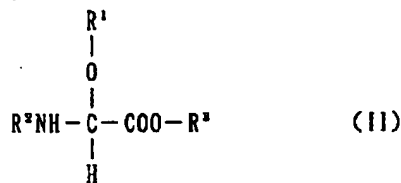
【化4】



(式中、 R^1 は水素原子、低級アルキル基、低級アルケニル基、低級アルキニル基、ベンジル基又はアルキル基によりもしくはアルキル基と芳香族基とにより置換されたシリル基を表わし； R^2 は水素原子又はアミノ保護基を表わす) により表わされる α -ヒドロキシグリシンアミド誘導体、及びその塩を提供する。

【0008】本発明はさらに、前記の α -ヒドロキシグリシンアミド誘導体又はその塩の製造方法であって、次の式 (II)：

【化5】



(式中、 R^1 及び R^2 は式 (I) において定義したのと同じ意味を有し、そして R^3 は水素原子又はカルボキシル保護基である) で表わされる α -ヒドロキシグリシン誘導体を溶媒中アンモニアで処理し、所望によりアミノ保護基を除去し、そして所望により得られた化合物をその塩に転換することを特徴とする方法を提供する。

【0009】本発明はさらに、アミノ酸もしくはペプチドを又はこれらの誘導体を前記の α -ヒドロキシグリシン誘導体と反応せしめることを特徴とするC-末端アミド化ペプチドの製造方法を提供する。

【0010】

【具体的な説明】本発明において、 R^1 の低級アルキル基は6個以下、好ましくは4個以下の炭素原子を有するアルキル基であり、例えばメチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 $tert$ -ブチル基、分岐していてもよいペンチル基又は分岐していてもよいヘキシル基である。

【0011】 R^1 の低級アルケニル基は、炭素原子数6個以下、そして好ましくは4個以下のアルケニル基であり、例えばエチニル基、アリル基、任意の位置に二重結合を有するブテニル基等である。 R^1 の低級アルキニル基は、炭素原子数6個以下、そして好ましくは4個以下のアルキニル基、例えばエチニル基、等である。

【0012】 R^1 の低級アルキル基により置換されたシリル基は、1~3個の低級アルキル基により置換されたシリル基であり、この場合の低級アルキル置換基は、 R^1 について前に記載した低級アルキル基のいずれか、又はそれらの組合せである。低級アルキル基により置換さ

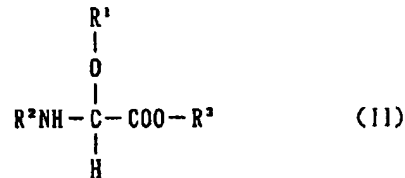
れたシリル基は、好ましくは $tert$ -ブチルジメチルシリル基である。アルキル及び芳香族基により置換されたシリル基は、前記のアルキル基及びフェニル基により置換されたシリル基であり、例えば $tert$ -ブチルジフェニルシリル基である。

【0013】 R^1 のアミノ保護基としては、アミノ酸又はペプチド化学の分野において常用されている保護基を使用することができ、例えばオキシカルボニル型保護基、例えばベンジルオキシカルボニル (Cbz-)、 p -メトキシベンジルオキシカルボニル (Z (OMe)-)、 $tert$ -ブトキシカルボニル (Boc-)、又は2-ピフェニルイソプロポキシカルボニル (Bpoc-) 等；アシル型保護基、例えばHCO-、フタレート基 (Ph t-)、又は o -ニトロフェニルチオ基 (Nps-) 等；あるいはアルキル基保護基、例えばトリフェニルメチル基 (Tr t-) 等を用いることができる。

【0014】本発明の α -ヒドロキシグリシンアミド誘導体の塩は酸付加塩であり、例えば無機塩、例えばハロゲン化水素酸塩、例えば弗化水素酸塩、塩酸塩もしくは臭化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、又はリン酸塩、あるいは有機酸塩、例えば蟻酸塩、酢酸塩、等が挙げられる。

【0015】本発明の式 (I) により示される化合物は、例えば、次の式 (II)

【化6】



(式中、 R^1 及び R^2 は式 (I) において定義したのと同じ意味を有し、そして R^3 は水素又はカルボニル保護基である) で表わされる α -ヒドロキシグリシン誘導体を溶媒中でアンモニアで処理し、所望によりアミノ保護基 R^3 を除去することにより製造することができる。

【0016】カルボニル保護基 R^3 はアンモニアによる処理によりアミノ基により置換され得る常用のカルボキシル保護基であり、例えば、低級アルキルオキシ基、例えばメトキシ基 (-OMe)、エトキシ基 (-OEt)、ベンジルオキシ基 (-OBz l) 又は $tert$ -ブトキシ基 (-Ot Bu)、あるいはアリールオキシ基、例えば p -ニトロフェノキシ基 (-ONp)、等である。

【0017】反応のための溶媒としては、低級アルコール、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、エーテル、例えばメチルエチルエーテル、ジエチルエーテル、イソプロピルエーテル、等、常用の有機溶媒を使用することができる。反応は式 (II) で示される化合物を前記の溶媒に溶解した溶液にアンモニアを、例えば-78℃~40℃、好ましくは0℃~25℃、例えば室温において、減圧下、常圧下又は加圧下で、吹き込むことに

5

より行うことができる。

【0018】この反応により、 R^2 がアミノ保護基である本発明の化合物 (I) が得られる。この化合物から R^2 のアミノ保護基を除去して R^2 が水素である本発明の化合物 (I) を得るには、アミノ保護基 R^2 の種類に応じて通常の脱保護処理を行えばよい。例えば保護基 R^2 がベンジルオキシカルボニル、*p*-メトキシベンジルオキシカルボニル等である場合、水素化触媒、例えばパラジウム/炭素等の存在下で水素ガスで処理することにより脱保護を行うことができる。また保護基 R^2 が *tert*-ブトキシカルボニルである場合、塩酸/ジオキサンにより脱保護を行うことができる。本発明の化合物 (I) の塩は、例えば前記脱保護処理を、酸、例えば塩酸の存在下で行なうことにより製造することができる。

【0019】中間体化合物 (II) の内 R^1 が水素原子でない化合物は、例えば次の2つの方法により製造することができる。1つは式 (II) で示される化合物の内 R^1 が水素である化合物に水素以外の R^1 を導入することにより製造することができる。水素以外の基 R^1 の導入は、対応する基の官能性誘導体、例えばハロゲン誘導体により行うことができる。例えば低級アルキル置換シリル基の導入のためにはシリル基のハロゲン化物により、例えば *tert*-ブトキシジメチルシリル基の導入には塩化 *tert*-ブチルジメチルシリルを用いることができる。この反応はジメチルホルムアミド等の溶媒中0℃～30℃の温度において行うことができる。

【0020】また、低級アルケニル又は低級アルキニル基の導入のためには対応するアルケン又はアルキンのハロゲン誘導体を用いることができ、例えばアリル基の導入のためには、酸化銀のごとき触媒の存在下ヨウ化アリルのごときハロゲン化アリルを用いて行うことができる。この反応は、例えばジメチルホルムアミド等の溶媒中、-10℃～50℃、好ましくは0℃～25℃において行うことができる。

【0021】 R^1 が水素でない中間体化合物 (II) を製造するための他の方法は、 R^1 及び R^2 が共に水素原子である式 (II) の化合物を、低級アルコール、例えばメタノール又はエタノールを溶媒として用いて塩化チオニルにより処理する方法であり、この場合には R^1 及び R^2 が同一でありかつ前記低級アルコール溶媒に対応する低級アルキル基である式 (II) の化合物が得られる。この反応は-10℃～40℃、好ましくは0℃～25℃において行うことができる。

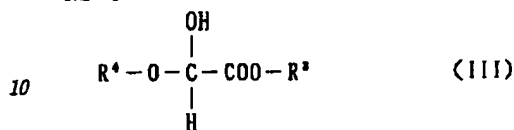
【0022】 R^1 が水素である式 (II) の中間体は、例えば次の2つの方法により製造することができる。一方の方法によれば、グリセルアルデヒド $\text{CHO}-\text{COOH}$ をアミノ保護基 R^2 により保護されたアミン $R^2 \text{NH}_2$ と反応せしめることにより得られる。この反応は、例えばアセトン、エーテル等の溶媒中で20℃～75℃にて、例えばPhilip X. Masciantonio ら、米国特許No.

6

3, 668, 121; Stanlen D. Young ら、J. Am. Chem. Soc. 111, 1933(1989)により記載されている方法により行うことができる。この場合、 R^1 及び R^2 が共に水素原子である式 (II) の化合物が得られる。

【0023】 R^1 が水素である式 (II) の中間体を製造するための他の方法は、次の式 (III) :

【化7】



(式中、 R^2 は式 (II) において定義したのと同じ意味を有し、そして R^4 は低級アルキル基を表わす) により示される化合物を、アミノ保護基 R^2 により保護されたアミン $R^2 \text{NH}_2$ と反応せしめる方法である。この反応は、例えばテトラヒドロフラン等の溶媒中で20℃～80℃の温度、例えば使用した溶媒の還流温度において行うことができる。なお、前記 R^4 の低級アルキル基は R^1 の低級アルキル基と同じ意味を有する。

【0024】こうした得られた、式 (I) で示される本発明のヒドロキシグリシン誘導体を用いてペプチド又はアミノ酸誘導体のC-末端のアミド化を行うことができる。このためには、式 (I) の化合物と、C-末端が保護されていないペプチドとを、非プロトン性溶媒、例えばジメチルホルムアミド (DMF)、ヘキサメチルリン酸トリアミド (HMPA)、ジメチルスルホキシド (DMSO) 等の中で、脱水縮合剤、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、水溶性カルボジイミド (WSCD) の存在下で反応させる。反応は、好ましくは-50℃～室温の範囲内で行う。

【0025】この方法は、例えば、C-末端がアミド化された生理活性ペプチド、例えばメラニン細胞刺激ホルモン放出抑制ホルモン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、カルシトニン類、例えばヒトカルシトニン、サケカルシトニン等の製造のために使用することができる。

【0026】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1.

1-1

α -ヒドロキシ-N-*tert*-ブトキシカルボニルグリシンメチルエステル (4.11g, 20mmol) とイミダゾールを室温でDMFにとかし0℃に冷却した。更にその溶液にその温度で塩化 *tert*-ブチルジメチルシリルを加え、10分間攪拌した。溶液を室温に戻して1時間攪拌した後、飽和食塩水を加え酢酸エチルにより抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。

【0027】得られた油状物質をエタノール (50ml) に溶かしその溶液に0℃で過剰のアモニアを吹き込ん

だ後、余剰のアンモニアを減圧下で取り除き、さらにエタノールを留去して得た粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、目的とする α -tert-ブチルジメチルシリルオキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンアミド (6.10 g, quantitative) を得た。 $^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 0.16 (s, 3H), 0.21 (s, 3H), 0.92 (s, 9H), 5.46 (d, 1H, J=9Hz), 5.63 (d, 1H, J=9Hz), 6.22-6.82 (br, 2H)

[0028] 1-2

前記1-1の出発物質である α -ヒドロキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンメチルエステルは次の様にして製造した。カルバミン酸tert-ブチル (2.83 g, 23.6 mmol) とグリオキシル酸一水和物 (2.02 g, 21.5 mmol) をアセトン (50 ml) に溶かし、一昼夜還流した。次にその溶液を0℃に冷却し、その温度で過剰のジアゾメタン-エーテル溶液と処理し、溶媒を留去した。

[0029] その後飽和食塩水を加えクロロホルムにより抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、溶媒を留去して得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、目的とする α -ヒドロキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンメチルエステル (2.56 g, 58%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.46 (s, 9H), 1.65 (br s, 1H), 3.84 (s, 3H), 5.27-5.52 (br, 1H), 5.59-5.90 (br, 1H)

IR (NaCl) 1755 (s), 1690 (s), 1528 (s) cm^{-1}

[0030] 1-3

前記1-1の出発物質である α -ヒドロキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンメチルエステルを、1-2とは別の方法によって製造した。カルバミン酸tert-ブチル (11.35 g, 95.0 mmol) と1-ヒドロキシ-1-メトキシ酢酸メチルエステル (14.35 g, 119.5 mmol) を無水THF (50 ml) に溶かし一昼夜還流した。その後いったん室温に戻して1-ヒドロキシ-1-メトキシ酢酸メチルエステル (1.15 g, 9.6 mmol) を加え、更に8時間還流した。反応溶液が室温に戻るまで放置した後、溶媒を留去し得られた粗生成物をクロロホルム-ヘキサン溶液から再結晶して、純粋な α -ヒドロキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンメチルエステル (16.42 g, 84%) を得た。

[0031] 実施例2. 前記1-2又は1-3に従って製造した α -ヒドロキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンメチルエステル (1.21 g, 5.9 mmol) をDMF (10 ml) に溶かし、室温で酸化銀 (1.04 g, 4.5 mmol) 及びヨウ化ベンジル (1.99 g, 9.1 mmol) を加えた。そのまま室温で一昼夜攪拌した後、沈澱をろ別し母液に水を加えて酢酸エチルで抽出した。抽出溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィ

ーにより粗精製した。

[0032] 得られた油状物質をエタノール (50 ml) に溶かしその溶液に0℃で過剰のアンモニアを吹き込んだ後、余剰のアンモニアを減圧下で取り除き、溶媒を留去して得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、 α -ベンジルオキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンアミド (0.397 g, 22%) を得た。

m.p. 115-120 °C

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.44 (s, 9H), 4.61 (d, 1H, J=11.3Hz), 4.79 (d, 1H, J=11.3Hz), 5.4 (d, 1H, J=9.0Hz), 5.75 (brd, 1H, J=9.0Hz), 6.00 (br, 1H), 6.52 (br, 1H), 7.35 (s, 5H)

IR (NaCl) 1698 (s), 1664 (s), 1502 (s), 732 (m), 695 (m) cm^{-1}

元素分析値 ($\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_2$): Calcd. C: 59.99, H: 7.19, N: 9.99

Obsd. C: 59.94, H: 7.33, N: 10.28

[0033] 実施例3. 前記1-2又は1-3に従って製造した α -ヒドロキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンメチルエステル (2.07 g, 10.1 mmol) をDMF (20 ml) に溶かし、室温で酸化銀 (1.39 g, 6.0 mmol) 及びヨウ化アリル (1.2 ml, 12.9 mmol) を加えた。そのまま室温で一昼夜攪拌した後、沈澱をろ別し母液に水を加えて酢酸エチルで抽出した。抽出溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去して更にチオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルにより抽出し反応副生成物であるヨウ素を取り除いた。

[0034] 得られた油状物質をエタノール (50 ml) に溶かしその溶液に0℃で過剰のアンモニアを吹き込んだ後、余剰のアンモニアを減圧下で取り除き、溶媒を留去し得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、 α -アリルオキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンアミド (0.625 g, 27%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.45 (s, 9H), 4.14 (dd, 2H, J=7.2, 1.8Hz), 5.11-5.56 (m, 3H), 5.70-6.20 (m, 2H), 6.33-7.01 (m, 2H)

IR (CDCl_3) 2975 (w), 1705 (s, br), 1498 (m), 990 (sh. w) cm^{-1}

[0035] 実施例4.

4-1

α -ヒドロキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシン (4.44 g, 19.7 mmol) をメタノール (20 ml) に溶かした溶液に、0℃で塩化チオニル (2.9 ml, 40.0 mmol) を滴下してその温度で30分攪拌し、さらに室温で2時間攪拌した。その後溶媒を留去し得られた粗生成物をメタノール (50 ml) に溶かした溶液を0℃に冷却し、過剰のアンモニアを吹き込んだ。

[0036] 反応終了後、余剰のアンモニアを減圧下で

除去し溶媒を留去して得た白色結晶を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、 α -エトキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンアミド (3.42 g, 73%) を得た。

m.p. 110-112 °C

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 3.44(s, 3H), 5.16(s, 2H), 5.31(d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 5.45-5.98(br, 2H), 6.28-6.68(br, 1H), 7.36(s, 5H)

IR(NaCl) 1680(s, br), 1540(s), 1520(s), 860(m), 700(m) cm^{-1}

元素分析値 ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{N}_2$): Calcd. C:55.46, H:5.92, N:11.76

Obsd. C:55.70, H:5.94, N:11.58

【0037】4-2

前記1-4における出発物質 α -ヒドロキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンは次のようにして製造した。カルバミン酸ベンジル (30.24 g, 0.2 mol) とグリオキシル酸一水和物 (20.26 g, 0.22 mol) をジエチルエーテル (200 ml) に溶かし、室温で一昼夜攪拌した後、生成した結晶をろ過、続くエーテル洗浄によって純粋な α -ヒドロキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシン (33.78 g, 75%) を得た。

m.p. 200-205 °C (分解)

$^1\text{H NMR}$ δ (CD_3OD) 5.12(s, 2H), 5.40(s, 1H), 7.34(s, 5H)

【0038】実施例5. 前記4-2に従って製造した α -ヒドロキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシン (2.26 g, 10.0 mmol) をエタノール (20 ml) に溶かした溶液に、-10 °Cで塩化チオニル (2 ml, 27.4 mmol) を滴下し、室温で一昼夜攪拌した。その後溶媒を留去して得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、 α -エトキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンエチルエステル (2.81 g, quant.) を得た。

m.p. 66-68 °C

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.22(t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$), 1.30(t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$), 3.70(q, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 4.24(q, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 5.15(s, 2H), 5.33(d, 1H, $J=9.7\text{Hz}$), 5.93(brd, 1H, $J=9.7\text{Hz}$), 7.35(s, 5H)

IR(NaCl) 1740(s), 1700(s), 1540(s), 760(m), 700(m) cm^{-1}

元素分析値 ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}$): Calcd. C:59.78, H:6.81, N:4.98

Obsd. C:60.03, H:6.88, N:4.89

【0039】実施例6. 前記4-2に従って製造した α -ヒドロキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシン (2.26 g, 10.0 mmol) をイソプロピルアルコール (20 ml) に溶かした溶液に、-10 °Cで塩化チオニル (2 ml, 27.4 mmol) を滴下し、室温で一昼夜攪拌した。その後溶媒を留去して得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、 α -イ

ソプロポキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンイソプロピルエステル (3.10 g, quant.) を得た。

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.16-1.37(m, 12H), 3.87-4.22(m, 1H), 4.57-5.20(m, 1H), 5.14(s, 2H), 5.33(d, 1H, $J=9.7\text{Hz}$), 5.93(brd, 1H, $J=9.7\text{Hz}$), 7.35(s, 5H)

IR(Neat) 1728(s, br), 1508(m), 740(m) cm^{-1}

【0040】実施例7. 実施例5に従って製造した α -エトキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンエチルエステル (2.29 g, 8.1 mmol) をエタノール (80 ml) に溶かし、0 °Cに冷却してその温度で過剰のアンモニアを吹き込んだ。反応終了後、余剰のアンモニアを減圧下で除去し溶媒を留去して得た白色結晶をヘキサノール-酢酸エチル混合溶液で洗浄し、純粋な α -エトキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンアミド (1.51 g, 77%) を得た。

m.p. 119-121 °C

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.23(t, 3H, $J=7.1\text{Hz}$), 3.50-3.90(m, 2H), 5.14(s, 2H), 5.37(d, 1H, $J=9.0\text{Hz}$), 5.65-5.96(br, 2H), 6.41-6.71(br, 1H), 7.35(s, 5H)

IR(NaCl) 1680(s), 1664(s), 1542(m), 1524(m), 760(w), 740(w), 700(m) cm^{-1}

元素分析値 ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}_2$): Calcd. C:57.13, H:6.39, N:11.10

Obsd. C:57.09, H:6.34, N:11.37

【0041】実施例8. 実施例6に従って製造した α -イソプロポキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンイソプロピルエステル (2.48 g, 8.0 mmol) をエタノール (40 ml) に溶かし、0 °Cに冷却してその温度で過剰のアンモニアを5時間吹き込みさらにアンモニア飽和状態で二日間攪拌した。反応終了後、余剰のアンモニアを減圧下で除去し溶媒を留去して得た白色結晶をヘキサノール-酢酸エチル混合溶液で洗浄し、純粋な α -イソプロポキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンアミド (1.64 g, 77%) を得た。

m.p. 111-113 °C

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.18(d, 3H, $J=4.4\text{Hz}$), 1.25(d, 3H, $J=4.4\text{Hz}$), 3.81-4.20(m, 1H), 5.15(s, 2H), 5.44(d, 1H, $J=9.0\text{Hz}$), 5.53-5.86(br, 2H), 6.37-6.73(br, 1H), 7.35(s, 5H)

IR(NaCl) 1668(s), 1660(s), 1538(m), 1530(m), 760(w), 740(w), 700(m) cm^{-1}

元素分析値 ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}_2$): Calcd. C:58.63, H:6.81, N:10.52

Obsd. C:58.60, H:6.82, N:10.54

【0042】実施例9. 実施例1(1-1)に従って製造した α -tert-ブチルジメチルシリルオキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンアミド (5.08 g, 16.7 mmol) をジオキサノール (10 ml) に溶かし、0 °Cに冷却して4N塩酸/ジオキサノール溶液 (17 ml) を加え、その温度で1時間攪拌した。反応を完結さ

せるために更にその温度で4N-塩酸/ジオキサン溶液を加え、室温まで温度を上げて1時間攪拌した。その後溶液にジエチルエーテルを加え、生成物をできるだけ沈澱させてろ過し、更にエーテルで洗浄した後、沈澱を減圧下で乾燥し純粋な α -ヒドロキシグリシンアミド塩酸塩(1.86g, 88%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ δ (DMSO- d_6) 4.99(br s, 1H), 7.62-8.03(br, 2H), 8.32-8.85(br, 3H)

IR (KBr) 1686(s), 1581(m), 1546(m), 1477(s), 843(m) cm^{-1}

【0043】実施例10. 実施例4(4-1)に従って製造した α -メトキシ-N-ベンジルオキシカルボニルグリシンアミド(0.24g, 1.0mmol)をメタノールに溶かし、室温で12Nの塩酸(0.1ml)及びパラジウム-炭素(50mg)を加え水素雰囲気下で、30分攪拌した。その後パラジウム-炭素をろ別し、母液の溶媒を留去することにより目的とする α -メトキシグリシンアミド塩酸塩(0.14g, quant)を得た。

$^1\text{H NMR}$ δ (CD_3OD) 3.35(s, 3H), 5.01(s, 1H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ (CD_3OD) 42.1, 84.3(d, $J=159.8\text{Hz}$), 170.3

【0044】実施例11. アミノ酸のアミド化

実施例9に従って製造した α -ヒドロキシグリシンアミド塩酸塩(72.6mg, 0.57mmol)、N-tert-ブトキシカルボニルフェニルアラニン(125.8mg, 0.48mmol)、及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(78mg, 0.58mmol)をジメチルホルムアミド(4ml)に溶かし、 -10°C に冷却して水溶性カルボジイミド(0.1ml, 0.55mmol)を滴下し 0°C まで温度を上げて2時間攪拌した。

【0045】その後水を加えてクロロホルムで抽出し有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し溶媒を留去、得られた粗生成物を分取用TLCを用いて精製し、目的とするN-tert-ブトキシカルボニルフェニルアラニンアミド(38mg, 30%)を得た。

m.p. 142-149 $^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{25} = +16.5^\circ$ (EtOH, $c=1.17$)

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.40(s, 2H), 3.07(d, 2H, $J=6.8\text{Hz}$), 4.36(dt, 1H, $J=7.9, 6.9$), 4.92-5.20(brd, 1H), 5.32-5.59(br, 1H), 5.59-5.93(br, 1H), 7.25(s, 5H)

【0046】実施例12. アミノ酸のアミド化

実施例9に従って製造した α -ヒドロキシグリシンアミド塩酸塩(0.122g, 9.6mmol)、N-tert-ブトキシカルボニルプロリン(0.169g, 0.79mmol)、及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(0.129g, 0.95mmol)をジメチルホルムアミド(5ml)に溶かし、 -10°C に冷却して水溶性カルボジイミド(0.1ml, 0.55mmol)を滴下した。その温度で5分間攪拌した後、 0°C まで温度を上げてさらに4時間攪拌した。

【0047】その後食塩水を加えてクロロホルムで抽出

し有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し溶媒を留去、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、目的とするN-tert-ブトキシカルボニルプロリンアミド(0.081g, 48%)を得た。

m.p. 104-106 $^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{25} = -40.5^\circ$ (EtOH, $C=1.1$)

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 1.40(s, 9H), 1.65-2.48(m, 4H), 3.27-3.63(brt, 2H), 4.18-4.41(br, 1H), 5.88-7.02(br, 2H)

10 【0048】実施例13. トリペプチドのアミド化

実施例9に従って製造した α -ヒドロキシグリシンアミド塩酸塩(0.58g, 4.6mmol)、N-tert-ブトキシカルボニル-L-プロリル-L-ロイシルグリシン(1.37g, 4.2mmol)、及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(0.63g, 4.7mmol)をジメチルホルムアミド(15ml)に溶かし、 -10°C に冷却して水溶性カルボジイミド(0.85ml, 4.6mmol)を滴下した。その温度で20分間攪拌した後、 0°C まで温度を上げてさらに一昼夜攪拌した。

20 【0049】その後食塩水を加えてクロロホルムで抽出し有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し溶媒を留去、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、目的とするN-tert-ブトキシカルボニル-L-プロリル-L-ロイシルグリシンアミド(0.726g, 53%)を得た。

m.p. 119-121 $^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{25} = -51.0^\circ$ (DMF, $C=0.73$)

$^1\text{H NMR}$ δ (CDCl_3) 0.91(d, 3H, $J=5.4\text{Hz}$), 0.95(d, 3H, $J=5.4\text{Hz}$), 1.46(s, 9H), 1.20-2.45(m, 7H), 3.45(t, 2H, $J=6.6\text{Hz}$), 3.91(brd, 2H, $J=5.93\text{Hz}$), 4.08-4.53(m, 2H), 5.78(b s, 1H), 6.76(bs, 1H), 7.03(bs, 1H)

【0050】実施例14. アミノ酸のアミド化

実施例10に従って α -メトキシグリシンアミド塩酸塩(70mg, 0.5mmol)、N-tert-ブトキシカルボニルフェニルアラニン(106mg, 0.4mmol)、及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(69mg, 0.5mmol)をジメチルホルムアミド(2ml)に溶かし、 -10°C に冷却して水溶性カルボジイミド(0.1ml, 0.55mmol)を滴下し、 0°C まで温度を上げて2.5時間攪拌した。その後食塩水を加えてクロロホルムで抽出し有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し溶媒を留去、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、目的とするN-tert-ブトキシカルボニルフェニルアラニンアミド(37mg, 35%)を得た。

40 【0051】実施例15. α -ヒドロキシ-N-tert-ブトキシカルボニルグリシンメチルエステル(1.03g, 5.0mmol)及びイミダゾール(0.41g, 6.1mmol)をジメチルホルムアミド(3ml)に溶解し、そしてこの溶液を -10°C に冷却した。この溶液に

tert-ブチルジフェニルシリルクロリド (TBDPSCl) を添加し、そして混合物を室温にて2時間攪拌した。この混合物を水で希釈し、そして酢酸エチルで溶出した。有機相を塩水で洗浄し、そして無水硫酸マグネシウムで乾燥し、そして溶剤を減圧下で蒸発させた。

【0052】生成する結晶性残渣をエタノール (100 ml) に溶解し、そしてこの溶液に0℃にて3時間アンモニアを吹き込んだ。5℃にてさらに1時間攪拌した後、過剰のアンモニアを真空蒸発せしめた。溶剤の蒸発の後、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) により精製してα-tert-ブチルジフェニルシリルオキシ-N-tert-ブチルキカルボニルグリシンアミド (2.14 g、定量的) を得た。

¹H NMR δ (CDCl₃) 1.07 (s, 9H), 1.31 (s, 9H), 5.25 (d, 1H, J=8.7 Hz), 5.44 (d, 1H, J=8.7 Hz), 6.14 (br, 1H), 6.49 (b, 1H), 7.26-7.55 (m, 6H), 7.58-7.82 (m, 4H)

IR (NaCl) 1708 (s), 1690 (s), 1678 (s), 1520 (m), 1080 (br, m), 740 (m), 700 (m) cm⁻¹

【0053】実施例 16. α-ヒドロキシ-N-ベンジロキシカルボニルグリシン (1.12 g, 5.0 mmol) を2-プロピオン-1-オール (5 ml) に溶解し、そして0℃にて塩化チオニル (1.1 ml, 15 mmol) を滴加した。混合物を0℃から室温になるまで14時間攪拌した。溶剤を真空除去し、そして生ずる粗生成物をエタノール (30 ml) に溶解した。この溶液に0℃にてアンモニアを吹き込み、そしてこの混合物をアンモニア雰囲気下、室温にて一夜攪拌した。

【0054】過剰のアンモニアを真空除去し、そして溶剤を減圧蒸発せしめた。生成する油状残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) により精製してα-(2-プロピオン-1-オキシ)-N-ベンジロキシカルボニルグリシンアミド (1.22 g, 93%) を得た。

m.p. 80-83℃

¹H NMR δ (CDCl₃) 2.46 (t, 1H, J=2.4 Hz), 4.28 (d, 2H, J=2.4 Hz), 5.10 (s, 2H), 5.48 (d, 1H, J=8.8 Hz), 6.48 (d, 1H, J=8.8 Hz), 6.65 (bs, 2H), 7.31 (s, 5H).

IR (NaCl) 2125 (w), 1704 (s), 1680 (s), 1522 (s), 758 (w), 740 (m), 700 (m) cm⁻¹

元素分析値 (C₂₁H₂₄N₂O₄): 計算値 C: 59.54, H: 5.38, N: 10.68

測定値 C: 59.73, H: 5.51, N: 10.33

【0055】実施例 17. N-tert-ブチルキカルボニル-L-プロリル-L-ロイシル-グリシンアミド (0.325 g, 1.0 mmol) をジオキサン (2 ml) に溶解し、そして0℃に冷却した。この溶液にジオキサン (3 ml) 中4 N塩酸をこの温度において添加し、そして混合物を室温にて2.5時間攪拌した。

【0056】次に、この溶液にエーテルを加え、そして生成する沈澱を濾過によりできるだけ多く集め、エーテルで洗浄し、そして真空乾燥して純粋なL-プロリル-L-ロイシル-グリシンアミド HCl 塩 (0.265 g, 96%) を得た。

[α]_D²⁰ = -40.9° (H₂O, C=1.1)

¹H NMR δ (D₂O) 0.91 (d, 3H, J=5.8 Hz), 0.95 (d, 3H, J=5.8 Hz), 1.66 (m, 3H), 2.08 (m, 3H), 2.46 (m, 1H), 3.43 (m, triple, 2H), 3.91 (s, 2H), 4.41 (m, 2H)

【0057】実施例 18. α-ヒドロキシグリシンアミド塩酸塩 (38 mg, 0.3 mmol)、ピログルタミン-N-tert-ブチルキカルボニル-ヒスチジルプロリン・トリエチルアミン塩 (55 mg, 0.1 mmol) 及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール (27 mg, 0.2 mmol) をジメチルホルムアミド (0.5 ml) に溶解し、そして-10℃に冷却した。この溶液に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (36 μl, 0.2 mmol) を添加し、そしてこの混合物を同じ温度にて2時間攪拌した。

【0058】室温にてさらに1時間攪拌した後、MPLC装置を用いて混合物を直接カラムクロマトグラフィーにかけた。粗生成物を分取用薄層クロマトグラフィー (クロロホルム-メタノール) によりさらに精製してピログルタミン-N-tert-ブチルキカルボニル-ヒスチジルプロリンアミド (15 mg, 35%) を得た。

m.p. 155-160℃

[α]_D²⁰ = -17.7° (MeOH, C=0.53)

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

C 07 K 7/36

C 07 K 99/46

識別記号

庁内整理番号

8318-4H

F I

技術表示箇所